

**Über die Gegenregulation des Organismus nach
intravenösen Heparin-Injektionen**

Fedon Mavromatis

Druck: Anneliese Schubert, München 5, Corneliusstraße 21, Telefon 21777

Aus der Medizinischen Poliklinik der Universität München

Direktor: Professor Dr. W. SEITZ

ÜBER DIE GEGENREGULATION DES ORGANISMUS NACH

INTRAVENÖSEN HEPARIN INJEKTIONEN

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfasst und einer Hohen Medizinischen Fakultät der
Ludwig - Maximilians - Universität zu München

vorgelegt von

Fedon Mavromatis
aus Istanbul



Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter : Privatdozent Dr. N. GOOSSENS

Mitberichterstatter : Professor Dr. W. SEITZ

Dekan : Professor Dr. W. BÜNGELER

Tag der mündlichen Prüfung: 17. VII. 1958

Meinen Eltern
gewidmet

ÜBER DIE GEGENREGULATION DES ORGANISMUS NACH

INTRAVENÖSEN HEPARIN INJEKTIONEN

Auf das Vorhandensein einer Gegenregulation nach Eingriffen in das Gerinnungssystem des Blutes ist von mehreren Autoren hingewiesen worden. GOOSSENS und DIRNBERGER (1), MERZ (2), (3), L. A. PALOS (4), E. PERLICK (5) u. a. machen auf die Existenz einer "negativen Nachschwankung" als Ausdruck der Gegenregulation, d. h., auf eine Verkürzung der Gerinnungszeit unter die Ausgangswerte nach Antikoagulantienmedikation, aufmerksam. GOOSSENS und DIRNBERGER betrachten das Gerinnungssystem als ein Pendelsystem, bei dem eine initiale Störung des Gleichgewichtes nur nach Ausschlägen in beiden Richtungen normalisiert werden kann. Die Richtigkeit dieser Betrachtungsweise bekräftigen sie durch Versuche, bei denen eine künstliche Verkürzung der Gerinnungszeit durch Injektion einer nicht letalen Thromboplastindosis, vom Organismus mit einer nachträglichen Verlängerung beantwortet wird. MERZ (2) betont die Gefahren, die ein zu frühes Absetzen, oder eine Unterdosierung der Antikoagulantien mit sich bringen können.

Nach L. A. PALOS (4) bilden Atmung, Kreislauf und Blutgerinnung eine funktionelle Einheit. Im Mechanismus der Blutgerinnung dominieren oxydative bzw. oxydoreduktive Prozesse, wobei Oxydation hemmend und Reduktion fördernd wirkt. Zwischen dem zirkulierenden Blut und den Geweben besteht ein dynamischer Gleichgewichtszustand, der die Gerinnungsfähigkeit des Blutes auf optimalem Niveau hält. Je nach Bedarf gelangen koagulationhemmende oder -steigernde Faktoren ins kreisende Blut. Unter pathologischen Verhältnissen wird dieses dynamische Gleichgewicht gestört. In diesem Falle sind im Organismus überkompensatorische Reaktionen zu beobachten bzw. auszulösen. Der Autor führt Versuche aus, bei denen nach i. v. Verabreichung von Heparin die Gerinnungszeiten sich sofort verlängern, nach 1 1/2 Stunden die Ausgangswerte erreichen, um später unter diese zu sinken und schließlich nach 3 Stunden wieder auf die normalen Ausgangswerte zu kommen. Im gleichen Sinne löst Thromboplastinverabreichung Gegenregulationen aus. Der Autor meint, daß die bei der Behandlung der Hämophilie (antihämophiles Globulin) beobachtete Ver-

schlechterung, auf eine Gegenregulation zurückzuführen sei. Dagegen beeinflusst eine kleine Dosis Heparin (1000 I.E.) durch gegenregulatorische Auswirkungen das Leiden günstig. E. PERLICK (5) hebt den Zusammenhang zwischen den vegetativen Regulationen und Gerinnungsfaktoren hervor. Er stellt fest, daß im Verlauf:

- a) eines orthostatischen Kollapses
- b) eines adäquaten Eingriffs an den Pressorezeptoren und einer Entfernung des Halsvagus sowie der Aortennerven,
- c) eines natürlichen Winterschlafes und einer pharmakodynamischen Blockade des vegetativen Nervensystems (wie Hibernation, Heilschlaf und potenzierte Narkose)
- d) einer Allgemeinerregung (ausgelöst durch cortikale Reaktionen sowie Elektroschock)

ausgeprägte Aktivitätsverschiebungen der Plasmagerinnungsfaktoren auftreten. In allen Stärkegraden sind Kompensations- und Gegenregulationsphasen bis zur Wirkungsumkehr zu erkennen. Das Ausmaß und die Richtung der regulativen Konzentrationsänderungen sind jeweils von der neurohumoralen Ausgangslage des Organismus abhängig. Normalerweise werden ausgeglichene mehrphasische Gegenregulationen beobachtet.

Die regulatorische Steuerung eines so komplizierten und sinnvollen Vorgangs, wie der Gerinnung, ist theoretisch denkbar, ja man möchte fast sagen unentbehrlich. Es gibt in der Biologie kein funktionelles System das etwa nicht regulatorisch gesteuert wäre, es sei an die Regulationen der Vasomotoren, des Wärmehaushaltes, des Blutzuckerspiegels, überhaupt an alle endokrin und vegetativ steuerbare funktionelle Einheiten des Organismus erinnert. Eine physiologische oder pathologische grobe Einwirkung auf ein solches System wird sofort mit regulatorischen oder sogar gegenregulatorischen, d.h. über den Ausgangswert hinauschießenden Maßnahmen beantwortet. Stellt etwa eine mittlere Dosis von Heparin, die die normale Gerinnungszeit über das fünffache verlängert, keinen groben Eingriff in das Gerinnungssystem dar ?

REHN (6) schreibt zum gleichen Thema: "Wir werden bei aller Bedeutung und Anerkennung der Gerinnungschemie nicht umhin können, die Gerinnung und ihre Entgleisung (Thromboembolie) von der physiologischen Perspektive aus zu betrachten. Dazu ist es nötig, sich die Auffassung zu eigen zu machen, daß auch für den Gerinnungsvorgang eine zentrale Steuerung vorhanden ist. Sie ist vegetativ und gehört zu den wichtigsten Ordnungsprinzipien, welche das Leben des Organismus garantieren. Bei der Blutgerinnung hat diese Organisation dafür zu sorgen, daß das Gerinnungspotential vor Überschießen durch das fibrinolytische und antikoagulierende Potential gebremst wird und

umgekehrt. So wird der Organismus nach beiden Seiten hin sowohl vor den Folgen der krankhaft überschießenden Gerinnung als auch gegen die Verblutung gesichert."

Unter diesen Voraussetzungen schien uns interessant, im Experiment eine erfassbare Gegenregulation nach intravenöser Verabfolgung von Heparin zu zeigen. In unserer Arbeitshypothese unterteilten wir die zu erwartende Gegenregulation in zwei Teilregulationen:

a) spezifische Gegenregulation. Unter dieser Bezeichnung verstehen wir diejenigen Maßnahmen, die der Körper ergreift, speziell in unserem Fall, um das überflüssige Heparin zu inaktivieren. Also die Regulation die gegen das Heparin gerichtet ist. Der Abbau des Heparins durch die Heparinase in der Leber, JQUES L. B. und KEERISZANTO E. (7), vermehrte Speicherung im reticuloendothelialen System, Ausscheidung durch die Niere, sind die hauptsächlichsten vom Körper getroffenen Vorkehrungen in diesem Sinne. Zu einer negativen Nachschwankung könnte es theoretisch durch diese Teilregulation kommen, wenn z. B. die vermehrte Heparinase das zugeführte Heparin zerstört und anschliessend die normalerweise im Blut sich befindenden körpereigenen heparinähnlichen Stoffe angreift, oder wenn die Produktion des körpereigenen Heparins in den Gewebsmastzellen aufhört, oder auch wenn die vermehrt gebildete Heparinase selbst gerinnungsaktiv ist.

b) eigentliche oder unspezifische Gegenregulation.

Darunter verstehen wir eine, gegen die abnorme Verlängerung der Gerinnungszeit (in unserem Fall durch Heparin bedingt), gerichtete Reaktion des Gerinnungssystems, durch die das Gerinnungspotential des Blutes gesteigert wird und es zu einer Verkürzung der Gerinnungszeit kommt. Diese verstärkte Gerinnungstendenz bleibt unerfassbar, solange das sehr aktive Heparin im Blut vorhanden ist und seine Wirkung entfaltet. Sobald es aber abgebaut und ausgeschieden wird, tritt sie in Form einer negativen Nachschwankung in Erscheinung. Unsere Vorstellung können wir im folgenden hypothetischen Versuch veranschaulichen.

In eine Versuchsperson injizieren wir eine bestimmte Menge Heparin (anstatt Heparin kann auch jede andere Substanz mit antikoagulierender Wirkung verwendet werden) und messen anschließend alle zwei Stunden die Gerinnungszeit. Die Abbildung (1) soll den Fall einer nicht vorhandenen Gegenregulation, Abbildung (2) den einer vorhandenen darstellen.

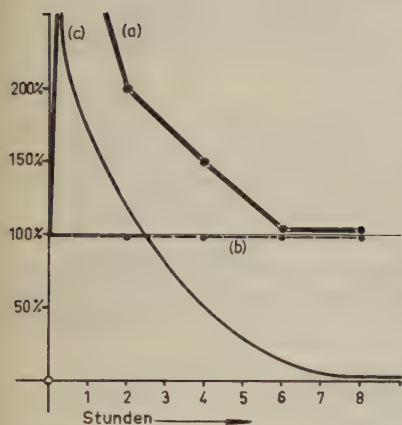


Abb. 1

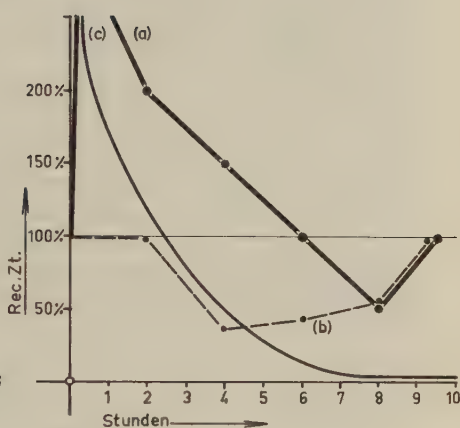


Abb. 2

- (a) —●— Rec.Zt. nach i.v. Heparinapplikation.
 (b) —●— Die Rec.Zt. des gleichen Blutes nach Ausschaltung der Heparinwirkung in vitro durch Protaminsulfat.
 (c) "Kurve „ Heparinkonzentration im Blut.

Die Kurve (a) stellt die einfache Messung der Gerinnungszeit dar. In der Abb. (1) haben wir zwei Stunden nach der Heparinisierung eine 200 prozentige Verlängerung (die normalen Ausgangswerte wurde als 100% angenommen), nach 4 Stunden 150% und nach 6 Stunden erreichen wir die Ausgangswerte. In der Abb. (2) beträgt die Verlängerung nach zwei Stunden ebenfalls 200%, nach 4 150%, in der sechsten sind die normalen Werte erreicht. Im weiteren Verlauf verkürzt sich die Gerinnungszeit in der 8 ten Stunde auf 50%, um sich nach der 10 ten zu normalisieren. Gleichzeitig mit der Gerinnungszeitbestimmung wird bei einem Teil des für diesen Zweck entnommenen Blutes in vitro die Heparinwirkung völlig aufgehoben und die Gerinnungszeit wieder gemessen. Die Ergebnisse sind in beiden Abbildungen als Kurve (b) registriert.

Abb. 1. Da wir uns das Heparin bei dieser Messung völlig entfernt oder inaktiviert vorstellen, muss die Gerinnungszeit immer nach 2 oder 4 oder 6 Stunden dem Ausgangswert gleich sein. Im Falle einer Gegenregulation (Abb. 2), die wir oben als eigentliche oder unspezifische Gegenregulation bezeichneten, verstärkt sich das Gerinnungspotential, so daß wir nach 4 Stunden eine Gerinnungszeitverkürzung

auf 40%, nach 6 auf 50% des Ausgangswertes haben. Mit dem Fortschreiten der Heparinelimination im Körper (Kurve c) nähern sich die zwei Kurven (a) und (b) einander, um nach der 8 ten Stunde, wo wir das Heparin als völlig ausgeschieden und abgebaut annehmen, zusammenzufallen.

Die Existenz einer negativen Nachschwankung und die Richtigkeit unserer Vorstellung über die Gegenregulation haben wir experimentell zu erforschen versucht. Es kam uns darauf an, die oben in unserem hypothetischen Experiment beschriebene Gegenregulationskurve (Kurve b) nachzuweisen, d. h. durch irgendeine Methode das in die Versuchsperson injizierte Heparin nachher in vitro völlig zu neutralisieren und damit die eventuell eintretende gegenregulatorische Gerinnungszeitverkürzungen erfaßbar zu machen. Diese Neutralisation haben wir mit dem bekannten Heparinantidot Protaminsulfat unternommen. Das Verständnis der praktischen Schwierigkeiten und der Grenzen einer solchen Neutralisation erfordert genaue Kenntnisse über den pharmakologischen und gerinnungsphysiologischen Wirkungsmechanismus des Protamins, bzw. des Heparins.

Das Heparin

Das 1918 durch McLean und Howell entdeckte Heparin stellt den physiologischen Hemmkörper sowohl der ersten als auch der zweiten Gerinnungsphase dar. Es findet sich in den Mastzellen vor allem der Leber und wird wahrscheinlich dort gebildet. JORPES und Mitarbeiter (8) erkannten das Heparin als einen Mucopolysaccharidpolyschwefelsäureester, bestehend aus 17,8% Glucuronsäure, 17,8% Glucosamin und Schwefelsäure mit einem Schwefelgehalt von 11,5 - 13,5 %, der je nach Veresterungsgrad und Herkunft des Präparates schwankt. Nach WOLFROM (9) hat Heparin die Bruttoformel $(C_{24}H_{31}O_{35}N_2S_5Na_7)_x$ Nach SNELLMANN (10) ist etwa $x=13$, das Molekulargewicht schwankt zwischen 12.000-16.000. Die Wirkung des Heparins dürfte auf seine starke Ionenladung zurückzuführen sein. Durch stark alkalische Protamine und Histone wie z. B. Protaminsulfat, durch Eiweißkörper, durch basische Farbstoffe wie das Toluidinblau, durch Nikotinsäure sowie durch Polybrene wird Heparin inaktiviert. 25-50% des injizierten Heparins werden durch die Niere ausgeschieden, diese Ausscheidung kann durch Caronamide gehemmt werden. Ein Teil des Heparins dürfte im reticuloendothelialen System gespeichert werden (PIPER (11)), das übrige wird in der Leber durch die Heparinase zerstört.

Obwohl bezüglich des Wirkungsmechanismus keine völlige Übereinstimmung besteht, kann als gesichert gelten, daß Heparin eine Antithrombinwirkung hat. Nach SNELLMANN (12) verbinden sich Heparin mit Thrombin. An dieser Reaktion dürfte ein Eiweißkörper als Co-

faktor beteiligt sein (Cofaktor I). Das Heparin ist mit dem Cofaktor II auch als Antiprothrombin wirksam. Nicht allgemein anerkannt aber sehr wahrscheinlich ist die Antithrombokinasewirkung des Heparins. Das Heparin besitzt schließlich eine fibrinolysefördernde Wirkung. Außer der Gerinnungshemmung besitzt Heparin eine Menge von Nebenwirkungen. Hier sei noch die Klärwirkung erwähnt. Wird Heparin einem Tier mit lipämischem Plasma injiziert, so kommt es zu einer Klärung des Plasmas. Das Verschwinden der sichtbaren Lipämie ist auf eine Veränderung der Teilchengröße der Lipoproteine zurückzuführen. Für die klärende Wirkung sind viel geringere Mengen Heparin erforderlich als für die Hemmung der Gerinnung. Das Heparin besitzt außerdem eine gefäßerweiternde Wirkung.

In der Klinik hat Heparin als polyvalentes und schnell wirkendes Antikoagulans eine große Bedeutung bei der Thromboembolieprophylaxe und Therapie erlangt.

Das Protamin

Die Protamine gehören zur Gruppe der einfachen Proteine. Sie bestehen aus einer relativ geringen Anzahl von Aminosäuren, unter denen das Arginin vorherrscht. Protamin-Roche wird aus Testikel von Salm-Arten hergestellt.

Das Heparin als ein stark elektronegativer Stoff bildet mit alkalischen Protaminen unlösliche Salze die wahrscheinlich keine Gerinnungsaktivität besitzen. Ein bestimmter Zusatz von Protaminsulfat in ein heparinisiertes Plasma hebt die Heparinwirkung auf, und die Gerinnungszeit wird sofort normalisiert. Durch diese Eigenschaft hat das Protaminsulfat als Heparinantidot klinische Bedeutung erlangt. Es vermag bei vielen Fällen uteriner Blutungen, auch wenn keine Heparinämie vorliegt, eine Blutstillung herbeizuführen. ALLEN und Mitarbeiter (13) benutzen das Protamin um das Heparin sozusagen zu titrieren. Bei dieser Methode wird die Gerinnung in vitro, durch einen Heparinzusatz labilisiert und anschließend diejenige Menge Protaminsulfat bestimmt, welche die Gerinnungszeit wieder normalisiert. Das Verhältnis Heparin zu Protamin dürfte bei dieser Reaktion 1 zu 1,5 sein. Diese Methode wird auf Grund der großen Fehlerbreite und der neueren Erkenntnisse über die Protaminwirkung, die beim Protamintitrationstest von Allen unberücksichtigt bleiben, von BELLER und STEICHELE (14) abgelehnt. SOULIER (15) lehnt ebenfalls ab. Das Protaminsulfat im Überschuß beeinflusst die Gerinnung im Sinne einer Hemmung, also gerinnungszeitverlängernd. Nach AMANN und WERLE (16) beruht diese Wirkung der organischen Basen auf einer Blockierung der Carboxylgruppen des Fibrinogens und der dadurch entstehenden Erschwerung der Anlagerung des Thrombins an sein Substrat. Geringe Protaminmengen haben eine gerinnungsfördernde Wirkung, die von

den gleichen Autoren auf eine Thrombinaktivierung zurückgeführt wird. MARBET, STUDER und WINTERSTEIN (17) bezeichnen das Protamin als ein echtes Antithromboplastin, das die Thromboplastinzeit zu verlängern imstande ist. Kleine Mengen zeigen jedoch keinen hemmenden Einfluß auf sie. Die durch Heparin verlängerte Thromboplastinzeit kann, durch den Einsatz verschiedenster Protaminmengen, bis zu einem gewissen Grad, nicht aber vollständig, normalisiert werden. Die Rekalkifizierungszeit verhält sich ähnlich. Sie wird durch Protamin - allerdings in geringerem Maß - verlängert. Eine vollständige Normalisierung der Rekalkifizierungszeit eines heparinisierten Plasmas ist ebenfalls nicht möglich. Dies ist nach der Meinung der Autoren darauf zurückzuführen, daß der Protamin-Heparin-Komplex eine gewisse Löslichkeit und damit eine gerinnungshemmende Aktivität besitzt. Die Thrombinzeit wird dagegen durch Protamin verkürzt. Die Autoren denken dabei an eine Aktivierung des Thrombins bzw. Labilisierung des Fibrinogens.

Das Protamin vermag offenbar nicht alle Wirkungen des Heparins aufzuheben. Die lädierte Plättchenfunktion läßt sich nicht wiederherstellen. So sieht man, daß noch lange nach Neutralisierung mit Protamin und noch lange nach Normalisierung der Gerinnungszeit die Retraktionszeit verlängert bleibt (MATIS, (18, 19)) (HARTERT, (20)). Unberührt bleibt auch die vasodilatative Wirkung während die Klärwirkung aufgehoben wird (MATIS, 21).

Wir haben diese Gerinnungsaktivität des Protamins experimentell zeigen können. Die Rekalkifizierungszeit des Menschenplasmas wird mit geringen Mengen Protaminsulfat leicht verkürzt mit größeren verlängert.

EXPERIMENTELLER TEIL

Angewandte Lösungen: Liquemin "Roche". 1 Ampulle zu 5 ccm = 25000 I. E.

Protaminsulfat "Roche". 1 Ampulle zu 5 ccm 1% Lösung.

Calciumchlorid. Lösung zu 0,6%.

.....

Wir haben sowohl beim Kaninchen wie auch beim Menschenplasma den Verlauf der Rekalkifizierungszeit, nach intravenöser Gabe einer kleinen Heparindosis, in zweistündlichen Abständen gemessen und kurvenmäßig aufgezeichnet. Bei einem Teil des entnommenen Blutes wurde die Heparinwirkung mit der entsprechenden Protaminmenge neutralisiert und ebenfalls die Rekalkifizierungszeit registriert. W

haben dadurch die eventuell auftretende gegenregulatorische Potenzierung der Gerinnungstendenz zu erfassen versucht. Geeignet schien uns die Rekalzifizierungszeitbestimmung, weil sie eine universelle, praktisch einfach durchführbare, und zum Erfassen der Heparinwirkung geeignete Methode ist. Ihre Streuung jedoch ist verhältnismäßig groß.

Versuchsanordnung: Aus der Cubitalvene (beim Kaninchen aus der mit Xylol-Alkohol-Gemisch erweiterten Ohrvene) wird zu 4 ccm einer 3,8% Natriumcitratlösung 16 ccm Blut aufgezogen, sofort durch mehrmaliges Umkippen der Spritze gut vermischt und anschließend der Versuchsperson Heparin injiziert (80 I. E. pro kg. Körpergewicht). Wir zentrifugieren das Blut 7 Minuten lang bei 2300 Umdrehungen. Das überstehende Plasma wird abpipettiert und die Rekalzifizierungszeit gemessen. Die Methode ist die folgende: 0,2 ccm Plasma werden im Wasserbad bei 37° Grad 3 Minuten lang erwärmt, 0,2 ccm von der ebenfalls vorgewärmten CaCl_2 Lösung hinzugesetzt und die Stopuhr in Gang gesetzt. Ungefähr jede Sekunde wird eine Platinöse durch das Gemisch gezogen. Die Gerinnung erkennen wir an der Bildung eines deutlichen Fibrinfadens, der an der Öse hängenbleibt. Diese Messung wiederholen wir 3 - 4 Mal. Der Mittelwert stellt den Ausgangswert dar (0-Wert). Bei dem übrigen Plasma wird, die durch den Zusatz verschiedener Protaminmengen bedingte Veränderung der Rekalzifizierungszeit gemessen. Zu diesem Zweck bereiten wir eine geometrische Verdünnungsreihe mit folgenden Protaminsulfatkonzentrationen vor: 0,5 ; 1 ; 2 ; 4, 8, 16, 32, 64, 125 gamma pro cm^3 . Als Verdünnungsmittel verwenden wir Veronalpufferlösung mit einem pH von 7,1. Zu 0,2 ccm Plasma wird mit einer Blutzuckerpipette 0,1 ccm der Protaminlösung zugesetzt und bei 37°C 5 Minuten inkubiert. Mit 0,2 ccm Kalziumchloridlösung rekalzifizieren wir und messen die Zeit bis zum Eintritt der Gerinnung wie oben beschrieben. Durch den Zusatz des stark verdünnten (ca. 1-4 8/ccm) Protamins bekommen wir eine leichte Verkürzung der Rekalzifizierungszeit. Mit aufsteigender Konzentration geht die Verkürzung, wie zu erwarten, in eine Verlängerung über (Abb. 3). Es kommt uns darauf an, die durch Protamin bewirkte maximale Verkürzung der Rekalzifizierungszeit zu erhalten. Es ist gleichgültig welche Protaminkonzentration dies bewirkt. Der so erhaltene Wert der maximalen Verkürzung stellt ebenfalls einen Ausgangswert dar. Jede bei den folgenden Blutentnahmen sich ergebende Verkürzung unter diesen Ausgangswert, d.h. wenn die durch irgendeine Protaminmenge bewirkte maximale Verkürzung der Rekalzifizierungszeit nach der Heparinisierung der Versuchsperson größer ist als zuvor, führen wir entsprechend der oben geschilderten Hypothese auf eine gegenregulatorische Gerinnungsaktivierung zurück.

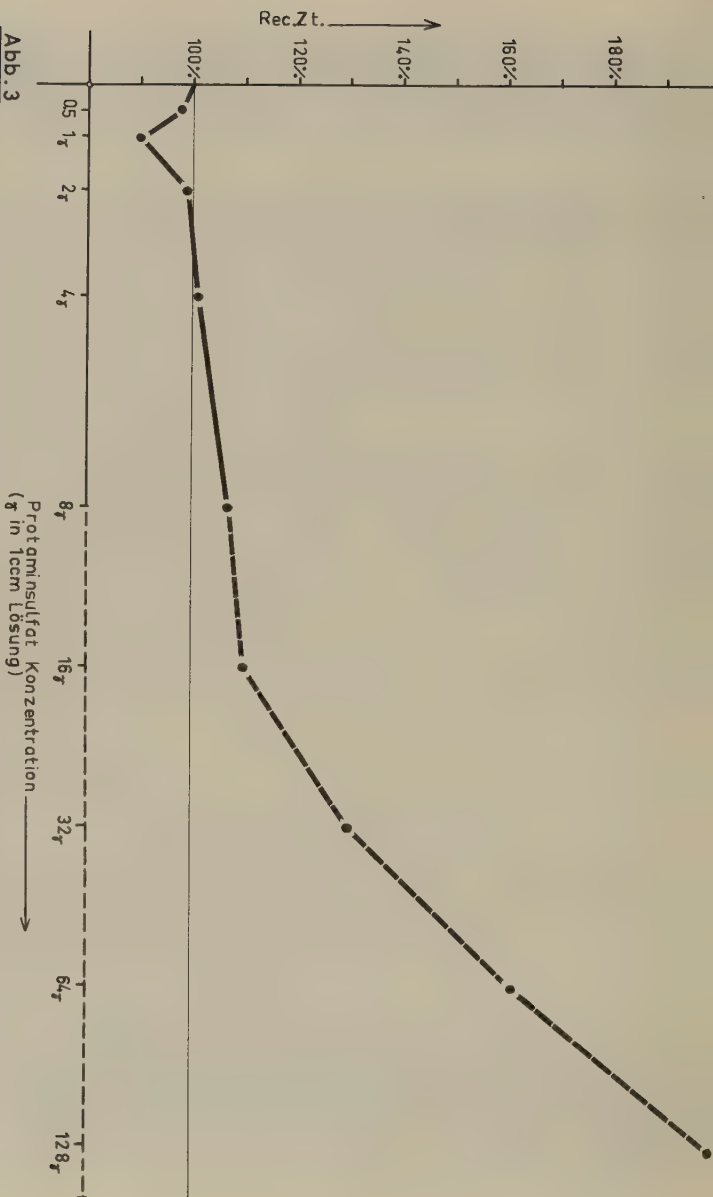


Abb. 3

Wirkung des Protamins auf die Rec.Zt. des Menschenplasmas.

(Die Kurve stellt den Mittelwert aus "3" Versuchsreihen dar)

"0.2ccm Plasma + 0.1ccm Protaminsulfatlösung + 0.2ccm CaCl₂"

—Jeder Versuchssatz, wurde "3" Mal bestimmt—

—Die Rec.Zt. wurde auf den Ausgangswert prozentualisiert—

Abhängigkeit der Rec. Zt. des Humanplasmas von der Protamin-
konzentration vor und nach Heparininjektion.

Ausgangswerte vor der Heparininjektion

Rec. Zt. des Plasmas sec.	Protamin Konzentration in /ccm					
	0, 5	2	4	8	16	32
251	174	192	170	132	146	256
268	199	169	148	161	148	280
254			141	141		
204						
244	186	180	153	145	147	268
100%					100%	Mittelwerte

2 Stunden nach 80 I. E. /kg Heparin i. v.

Rec. Zt. sec.	Protamin Konzentration in /ccm						
	0, 5	1	2	4	8	16	32
275				143	113	136	170
278				161	130	122	130
233					119	151	132
					112	127	
262				152	118	134	144
108%					81%		

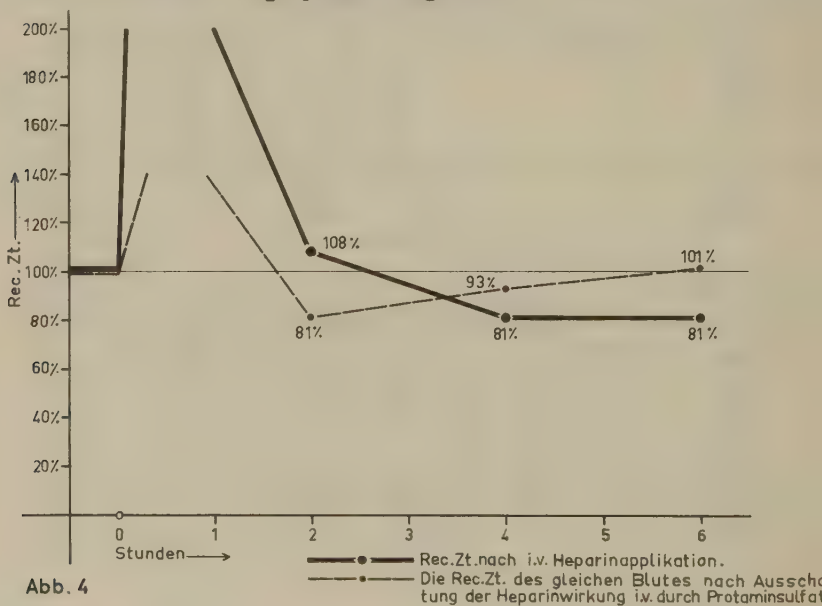
Nach 4 Stunden

Rec. Zt. sec.	Protamin Konzentration in /ccm						
	0, 5	1	2	4	8	16	32
202		162	127	161	152		
174		141	141	144	132		
213		138	134				
207							
199		147	135	152	142		
81%			93%				

Nach 6 Stunden

Rec. Zt. sec.	Protamin Konzentration in /ccm						
	0,5	1	2	4	8	16	32
183	174	137	166	151	188		
191	146	163	168	146	183		
202		153					
212							
197	155	151	167	148	185		
<u>81%</u>				<u>102%</u>			

Tabelle (1) stellt den Verlauf eines Versuches dar. Die Ausgangswerte sind als 100% gesetzt. Zwei Stunden nach der i. v. Heparininjektion hat sich die Rekalkifizierungszeit fast normalisiert. Die maximale Verkürzung durch das Protamin ist stärker als die des Ausgangswertes (81%). Nach weiteren zwei Stunden beträgt die Rekalkifizierungszeit ebenfalls 81%. Die maximale Protaminverkürzung 93%, wir erhalten sie mit einer stärkeren Verdünnung als die der 0-Werte. Ähnliche Werte finden wir nach der 6ten Stunde. Die Ergebnisse dieses Versuches sind in Abb. (4) graphisch dargestellt.



Die Folgerungen die man möglicherweise aus diesem Versuch ziehen kann sind, daß es zwei Stunden nach der Heparinsisierung zu einer gegenregulatorischen Gerinnungsaktivierung gekommen ist, die bei der einfachen Messung der Rekalzifizierungszeit durch das Vorhandensein des Heparins nicht in Erscheinung tritt, dagegen aber, wenn wir mit der entsprechenden Protaminmenge das Heparin neutralisieren sehr wohl zu erfassen ist. Nach 4 Stunden ist die Gerinnungszeit 80% des Ausgangswertes - eine leichte negative Nachschwankung -. Zu diesem Zeitpunkt ist das Heparin offensichtlich völlig ausgeschieden, da wir mit dem Protamin keine verkürzte Werte erhalten können.

In der gleichen oben beschriebenen Versuchsanordnung haben wir auch am Kaninchen gearbeitet, allerdings betrug die jeweils entnommene Blutmenge nicht 20 ccm wie beim Menschen, sondern 5 ccm. Unsere Protamintitration wurde dadurch ein wenig erschwert. Ein weiterer Unterschied ist, daß wir das Heparin beim Kaninchen höher dosiert haben (250 I. E. pro kg. Körpergewicht). Das Kaninchen besitzt bekanntlich ein ungefähr 2 Mal höheres Gerinnungspotential als der Mensch. Schließlich haben wir die Gerinnungszeitkontrollen häufiger vorgenommen.

Bevor wir die Ergebnisse unserer Versuche vorlegen, möchten wir auf die Fehlerquellen und praktischen Schwierigkeiten hinweisen.

- 1) Bei jeder Blutentnahme wird durch das Stechen Gewebe zerstört. Die dabei entstehende Gewebsthrombokinasen kann die Gerinnung des entnommenen Blutes in verschiedenem Maß beeinflussen. Die dadurch verursachte Gerinnungsaktivierung kann so stark sein, daß die kleine Ohrvene sofort thrombosiert, oder das Blut noch in der Spritze gerinnt. Um verwertbare Ergebnisse zu erhalten, ist eine gute Blutentnahmetechnik unbedingt erforderlich.
- 2) Durch die Blutentnahme wird besonders beim Kaninchen die Gerinnungsaktivität beeinflußt. Bei aufeinanderfolgenden Entnahmen soll die Gerinnungszeit eine zunehmende Verkürzung zeigen (GOOSSENS 22). Dabei sind offenbar zeitliche Abstände und entnommene Menge maßgebend. Wir haben keine solche Wirkung feststellen können. Die Gerinnungszeit schwankt in unserer Versuchsanordnung durch die Blutentnahme (5 ccm jede zweite Stunde, über 8 Stunden) bei zwei Kontrolltieren innerhalb der Fehlerbreite der Methode. (Abb. 5 und 6).

Tier Experimente

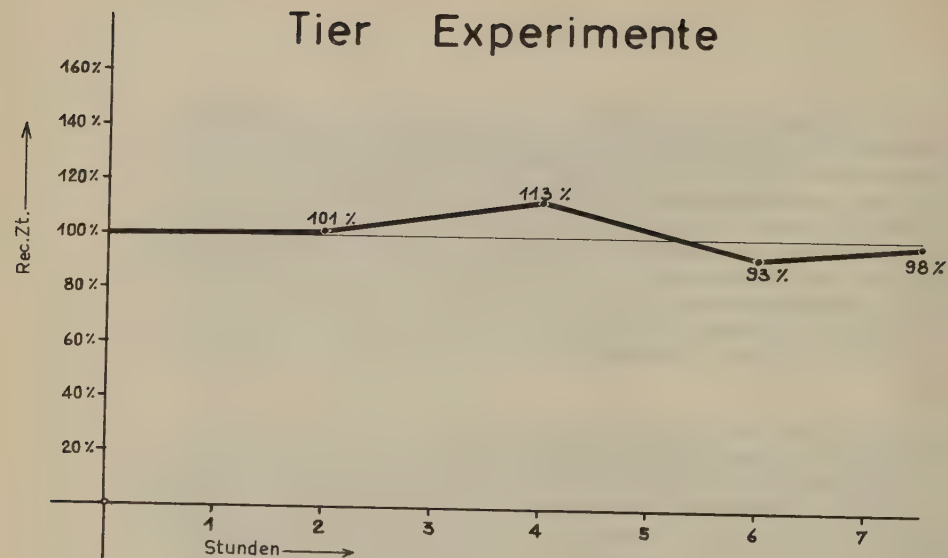


Abb.5

—●— Rec.Zt. des Kaninchenplasmas bei mehrfacher Blutentnahme

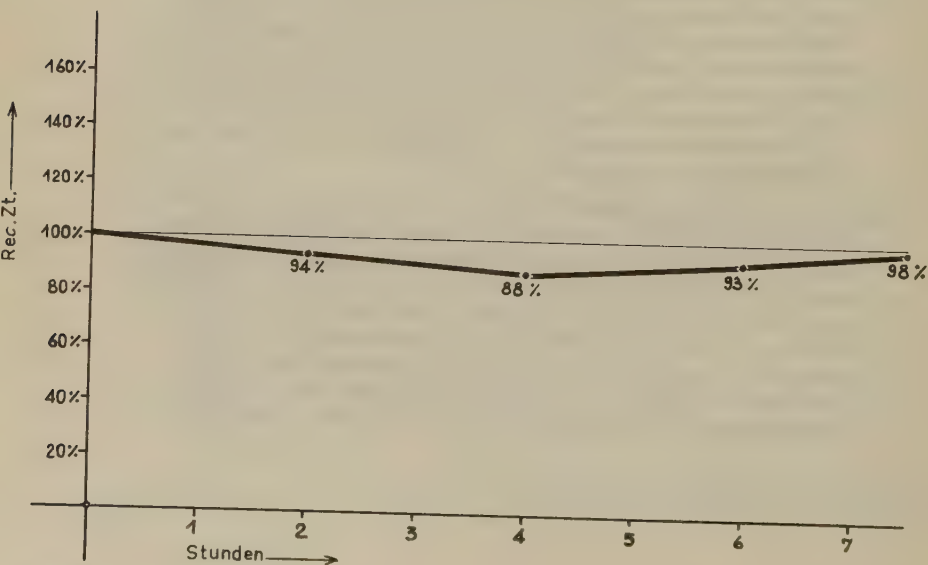


Abb.6

- 3) Auf immer gleichbleibende Versuchsbedingungen ist besonders zu achten. Das Zentrifugieren beeinflusst die Gerinnungszeit sehr stark. Je höher die Tourenzahl desto stärkere Sedimentierung der verhältnismäßig leichten Thrombozyten, infolgedessen stärkere Verzögerung der Gerinnung. Die Dauer des Vorwärmens und des Stehenlassens des Plasmas können auch erhebliche Fehlerquellen darstellen, die allerdings vermeidbar sind. Ein weiterer wichtiger Faktor ist die Wasserstoffionenkonzentration - das pH. Wir haben als Verdünnungsflüssigkeit Veronalpufferlösung mit einem konstanten pH von 7,1 verwendet. Genau so stark wie die Wasserstoffionenkonzentration beeinflussen die Gerinnung die Konzentrationen der anderen Ionen. Der geringste Zusatz von einer Verdünnungsflüssigkeit, physiologischer NaCl-Lösung, oder destilliertem Wasser kann den Ablauf der Rekalzifizierungszeit entscheidend beeinflussen.
- 4) Witterung und psychische Affekte sind ebenfalls nicht ohne Bedeutung (GÜNTHER und PICHOTKA 23).

In den folgenden Abbildungen werden die Ergebnisse unserer Versuche kurvenmäßig aufgetragen. Die praktische Durchführung ist die, wie wir sie oben ausführlich besprochen haben. Als 100% an den Ordinaten wurde der Ausgangswert vor der Heparinisierung genommen.

Kaninchen Versuche

Schema 5 und 6 stellen zwei Vorversuche dar, bei denen wir die Wirkung der einfachen Blutentnahmen auf die Gerinnungszeit gemessen haben. Es wurden jede 2 te Stunde 5 ccm Blut entnommen und der Wert der ersten Entnahme als 100% gesetzt. Wie wir aus den Kurven ersehen können, liegen die leichten Schwankungen absolut im Streubereich der Methode. Eine Beeinflussung der Rekalzifizierungszeit durch die Entnahme ist nicht vorhanden.

Abb. (7): Eine ausgeprägte negative Nachschwankung wobei die Reka.zeit zu 45% des Ausgangswertes gesunken ist.

Abb. (8): Neg. Nachschwankung 74%. Die Protaminneutralisationskurve zeigt, daß die gegenregulatorische Gerinnungszeitverkürzung viel früher einsetzt als wir sie durch die einfache Rekalzifizierungsmessung erfassen können. Bereits in der 2 ten Stunde haben wir nach Ausschaltung der Heparinwirkung eine 85% Verkürzung. Daß noch Heparin im Blut wirksam ist, zeigt uns die gleichzeitige 168% Verlängerung der Reka.zeit.

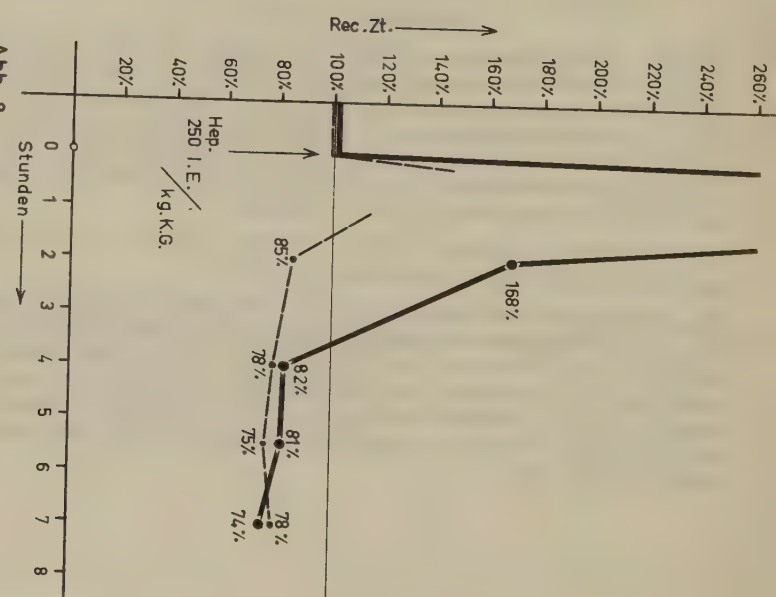
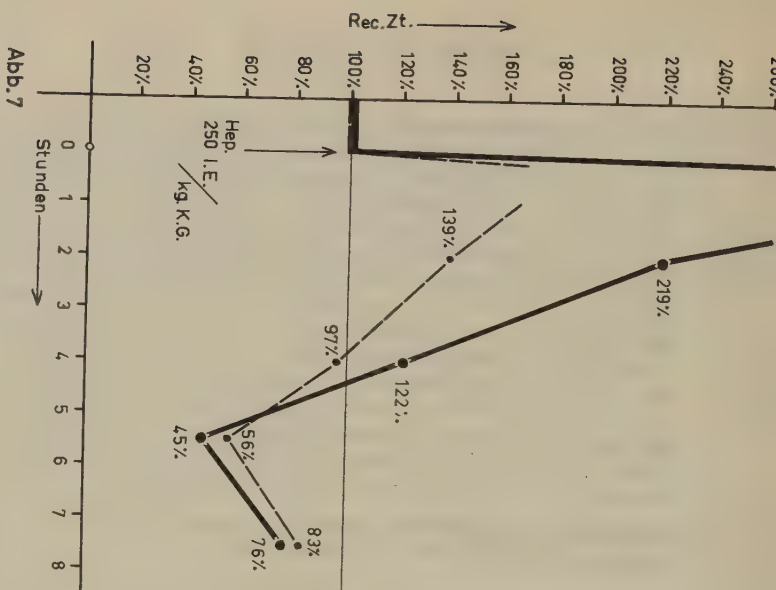


Abb. 7

Rec.Zt. nach i.v. Heparinapplikation.

Die Rec.Zt. des gleichen Blutes nach Ausschaltung der Heparinwirkung in vitro durch Protaminsulfit.

Abb. (9) und (10): Zwei Versuche bei denen keine Gegenregulation in Erscheinung tritt. Die eingespritzte Heparinmenge war ein wenig grösser als gewöhnlich.

Abb. (11): In diesem Fall ist keine Protaminneutralisation vorgenommen worden. Die Rekalkifizierungszeit aber bringt eine deutliche negative Nachschwankung, in der 6 ten Stunde nach der Heparininjektion, zum Ausdruck.

Abb. (12) und (13): In beiden Fällen mehr oder weniger deutliche negative Nachschwankung. Bei der Protamin-Kurve tritt die Gegenregulation sogar früher in Erscheinung.

Menschen Versuche

Abb. (14), (15) und (16): Sowohl durch die Rekalkifizierungszeit als auch durch die Protamintitration bekommen wir Zeichen einer Gegenregulation, die natürlich nicht so ausgeprägt sind wie beim Kaninchen. Das hängt vielleicht mit der geringeren Labilität des menschlichen Gerinnungssystems zusammen.

Abb. (17) und (18): Bei diesen Versuchen ist keine Gegenregulation zu beobachten.

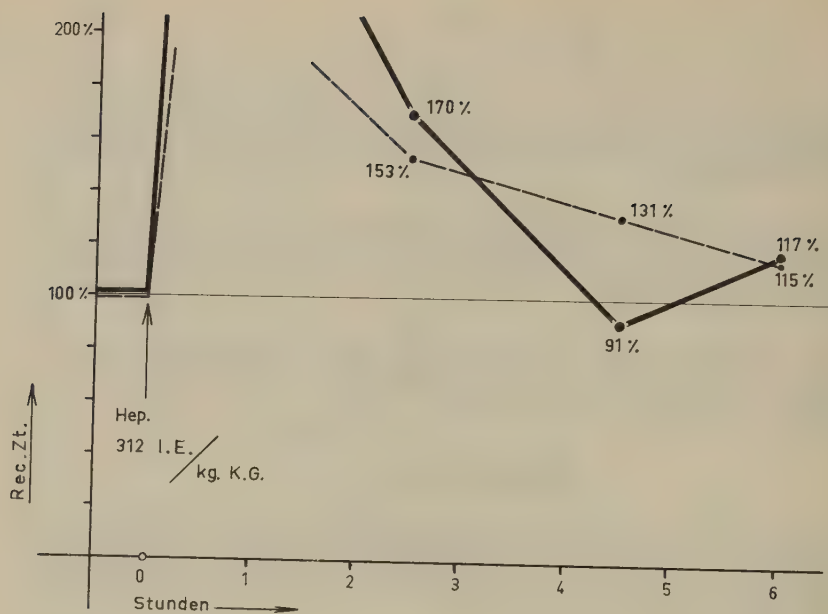


Abb. 9

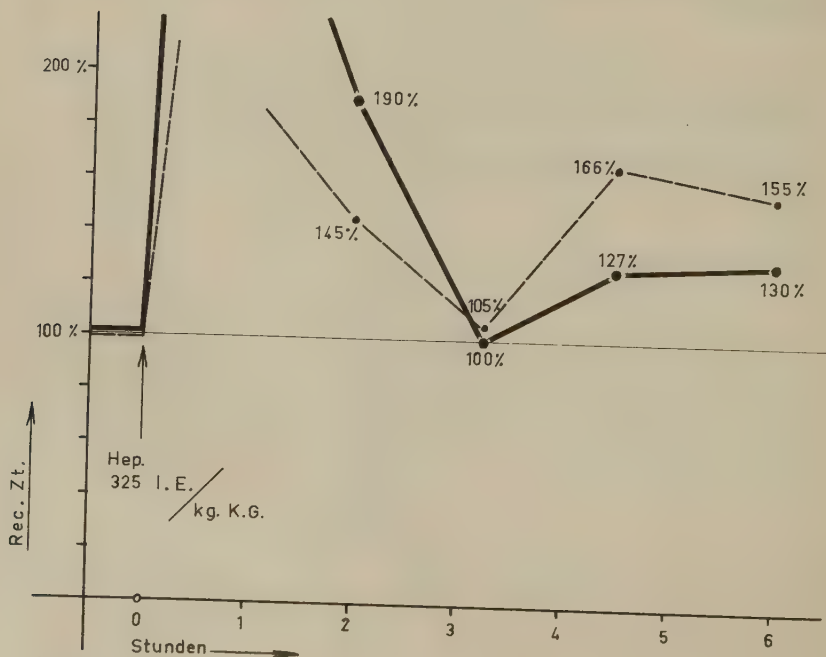


Abb. 10

Abb. 11

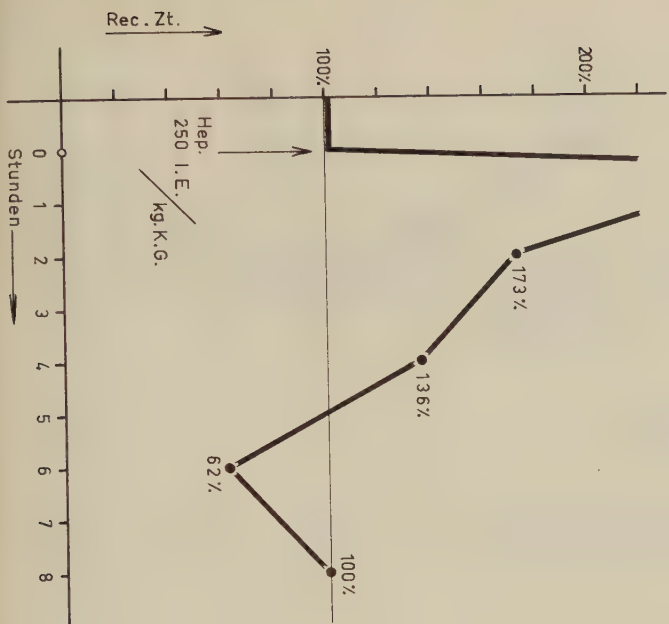
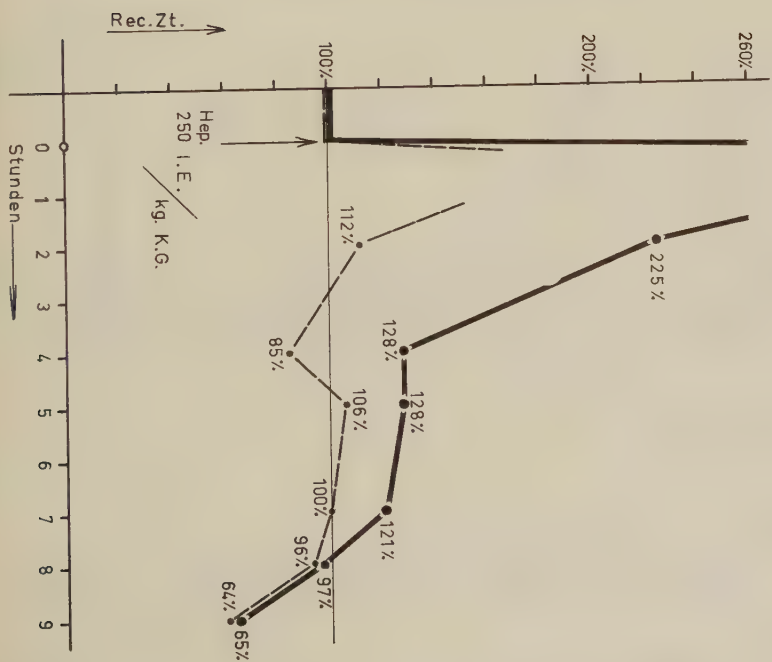


Abb. 12



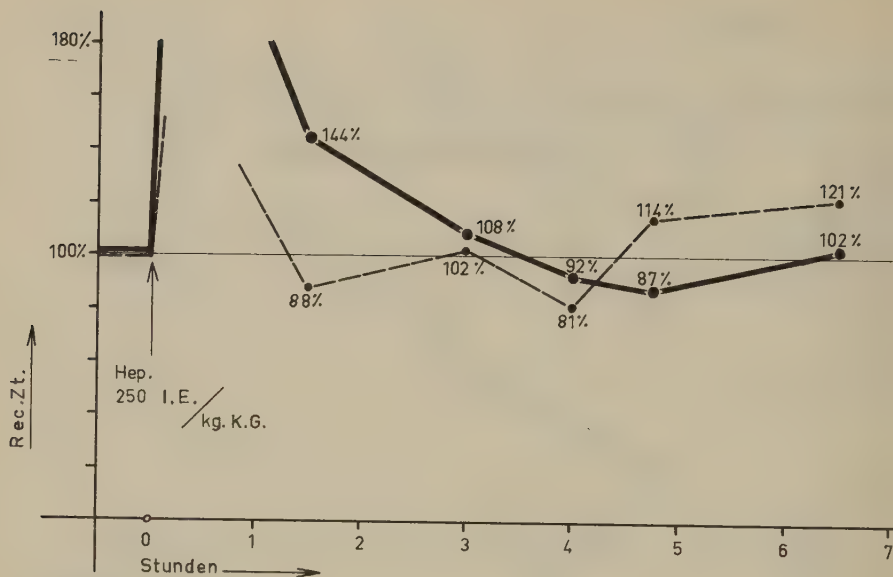


Abb. 13

Menschen Experimente

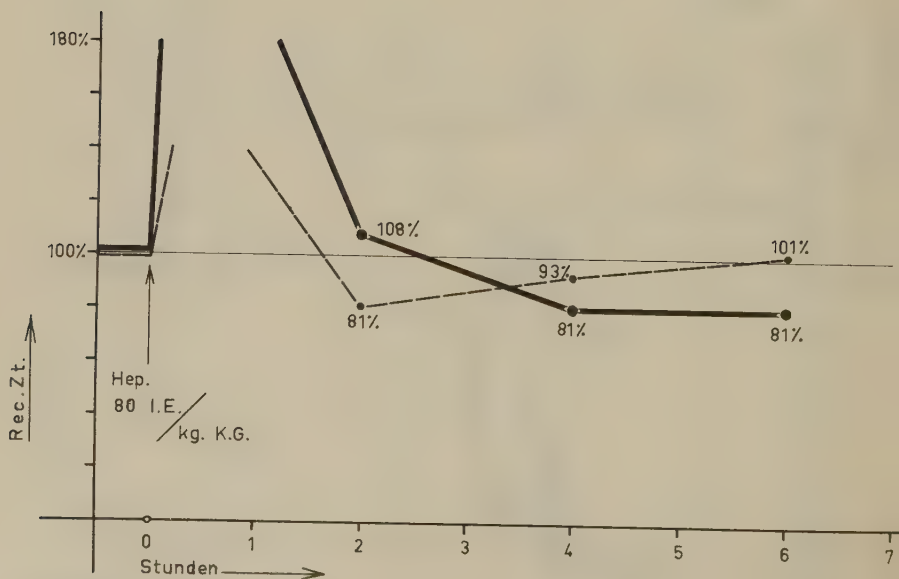


Abb. 14

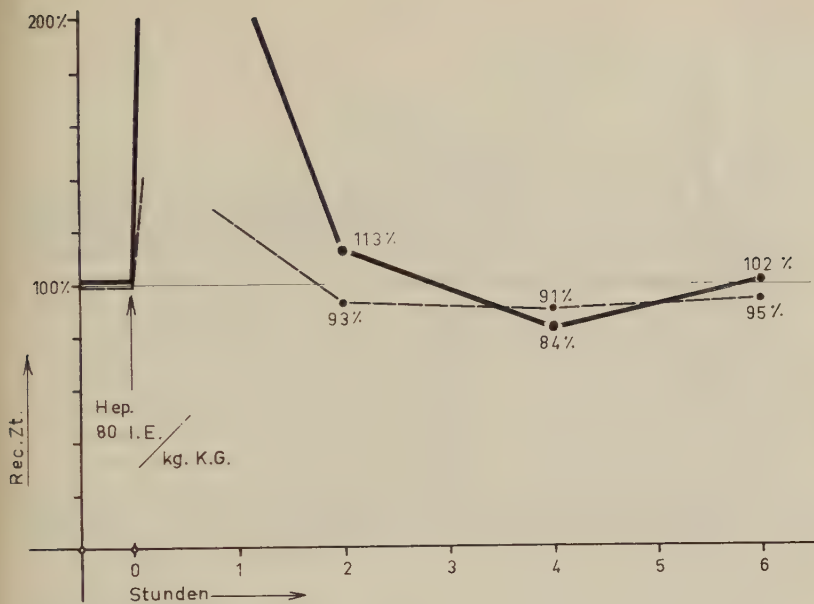


Abb. 15

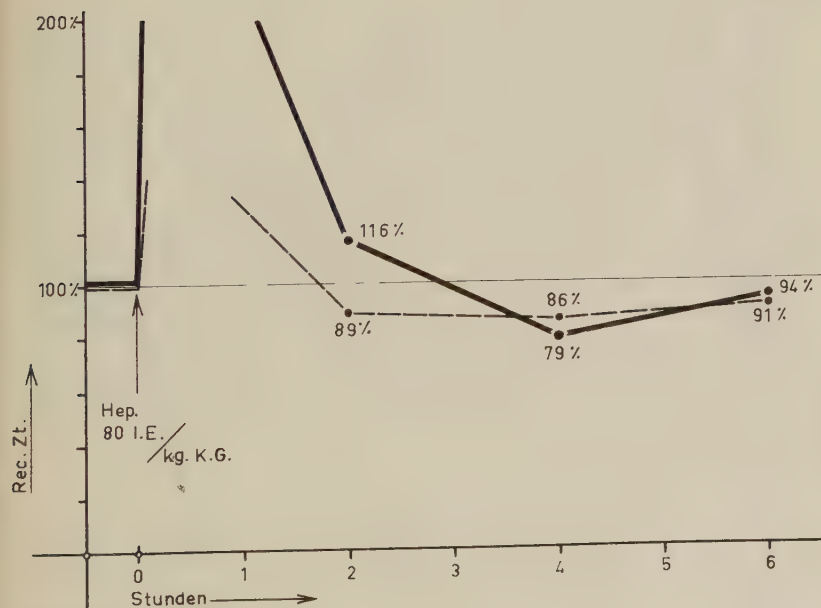


Abb. 16

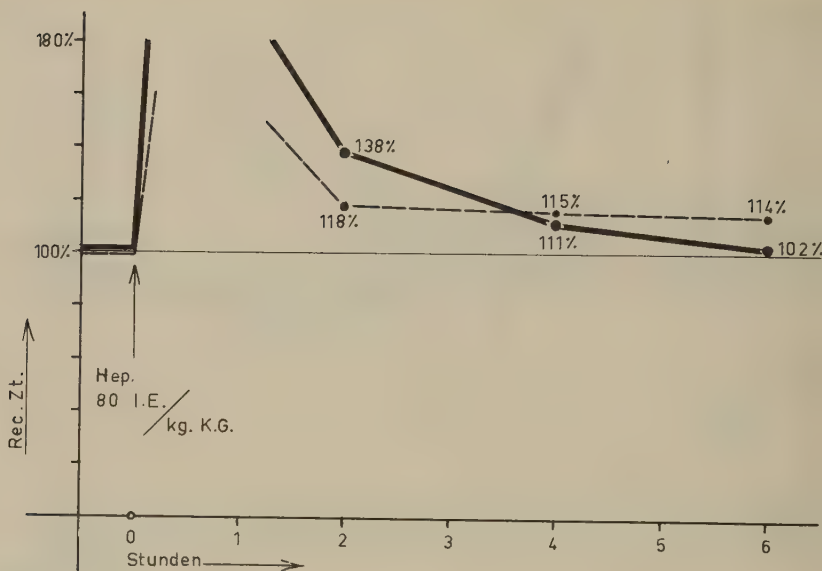


Abb. 17

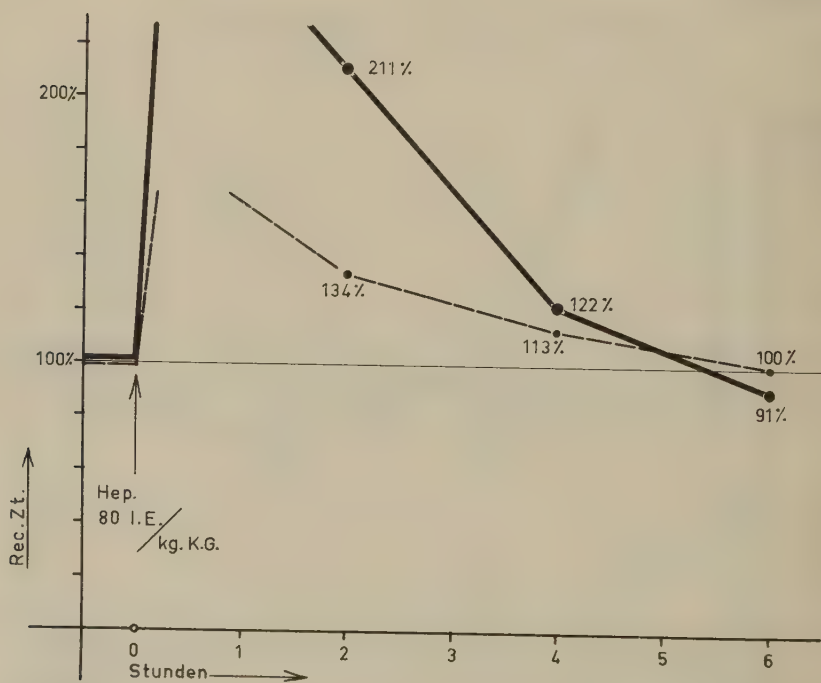


Abb. 18

Diskussion

Die kleine Anzahl unserer Versuche erlaubt keine statistische Bearbeitung und Auswertung der Ergebnisse. Trotzdem möchten wir auf das mehr oder weniger regelmäßige und zum Teil sehr ausgeprägte Auftreten der negativen Nachschwankung hinweisen, die sehr wahrscheinlich den Ausdruck einer gegenregulatorischen, überschüssigen Körperreaktion darstellt. Der Zeitpunkt zu dem sie auftritt ist verschieden. Eingespritzte Heparinmenge, individuelle Ausgangslage und Reaktion, vegetatives Nervensystem spielen eine große Rolle. Der negative oder positive Ausfall des Versuches hängt außerdem viel von dem Ausgangswert ab. Ein zufällig niedriger Ausgangswert (sei es durch technischen Fehler oder spontan entstanden) hat als Folge, daß die ganze Kurve höher verläuft als sie sonst täte; d.h. negativer Ausfall. Wir sind auch nicht immer sicher ob wir bei unseren negativ ausgefallenen Versuchen doch im richtigen Augenblick untersucht und dadurch eine zwischen zwei Untersuchungen aufgetretene negative Nachschwankung erfasst haben.

Mit dem Protamin haben wir die Heparinwirkung *in vitro* auszuschalten versucht, um dadurch die auftretende unspezifische Gegenregulation (eine Reaktion des Körpers gegen die künstliche Aufhebung der Gerinnungsfähigkeit) erfassbar zu machen. Dabei wurde die gerinnungsaktive Wirkung des Protamins berücksichtigt. Eine vollständige Neutralisation ist offenbar nicht möglich. Bei Rekalkifizierungszeiten, die um 200% verlängert sind, gelingt es uns nicht, auch mit der sorgfältigsten Protaminzugabe, die Ausgangswerte zu erreichen. (In diesem Fall stoßen wir auch auf rein technische Schwierigkeiten. Bei höherem Heparin Gehalt des Blutes benötigt man größere Mengen von Protamin. Durch die Eigenart der geometrischen Verdünnungsreihe aber sind die Stufenunterschiede zwischen den höheren Protaminkonzentrationen um so größer. So wird eine feine Dosierung der entsprechenden, *in vitro* zugesetzten Protaminmenge sehr schwierig). Bei kleineren Rekalkifizierungszeitverlängerungen gelingt es uns sehr oft mit Protamin sogar kürzere Werte als der Ausgangswert zu erhalten. Wir glauben für diese Verkürzung eine gegenregulatorische Gerinnungsaktivierung verantwortlich machen zu können. Bei unserer Versuchsanordnung kann theoretisch kaum ein anderer Grund dafür herangezogen werden. Die Tatsache, daß eine völlige Neutralisation nicht möglich ist, spricht in den Fällen, wo durch Protamin eine Verkürzung unter die O-WERTE eintritt, eher für eine Gegenregulation.

ZUSAMMENFASSUNG

- 1) Die nach Eingriffen in das Gerinnungssystem auftretende Gegenregulation unterteilen wir in:
 - a) eine gegen das applizierte Mittel gerichtete "spezifische",
 - b) eine gegen die abnorme Verlängerung der Gerinnungszeit gerichtete und in Form einer Verstärkung des Gerinnungspotentials des Blutes auftretende "unspezifische" Gegenregulation.
- 2) Wir untersuchten experimentell in vivo et in vitro die Reaktionen des Organismus nach Heparinanwendung. Die unspezifische Teilregulation bleibt, solange im Blut sich ausreichende Mengen vom applizierten Antikoagulans befinden, nicht faßbar. Aus diesem Grunde wird versucht durch Protaminsulfatzusatz die Heparinwirkung auszuschalten, um die unseres Erachtens vom Heparin überdeckte Gegenregulation, falls Vorhanden, nachweisen zu können.
- 3) Auf die pharmakologischen bzw. physiologischen Eigenschaften des Heparins und Protamins wird eingegangen. Die Fehlerquellen und die praktischen Schwierigkeiten der Methoden werden erörtert.
- 4) Versuche an Kaninchen und an Menschen zeigen nach i.v. Injektionen von kleinen Heparindosen zum Teil ausgeprägte negative Nachschwankungen. Sie treten durchschnittlich 4 - 5 Stunden nach der Heparinverabreichung auf. Bei Aufhebung der Heparinwirkung in vitro durch Protaminsulfat kommt in vielen Fällen die gegenregulatorische Reaktion viel früher zum Vorschein als die mit der Rekalzifizierungszeit gemessene negative Nachschwankung.

Herrn Professor Dr. W. Seitz bin ich für die Übernahme des Referates zum besonderen Dank verpflichtet.

Herrn Dr. N. Goossens möchte ich meinen herzlichsten Dank aussprechen. Die Überlassung des Themas und seine stetige, wertvolle Hilfe haben das Zustandekommen dieser Arbeit ermöglicht.

Literaturverzeichnis

1. Goossens, N. und Dirnberger, M.:
Med. Monatsschrift Nr. 5 1952 S. 279
2. Merz, W.R.:
Schweiz. med. Wschr. 407 (1953)
3. Merz, W.R.:
Die Behandlung der Thrombose und Lungenembolie mit Antikoagulantien.
S. Karger Verlag, Basel (1950)
4. Palos, L.A.:
Thrombose und Embolie. Int. Tag. Basel
(1954) B. Schwabe Ver. S. 54
5. Perlick, E.:
Thrombose und Embolie, Int. Tag. Basel
(1954) Schwabe Verl. S. 142
6. Rehn, E.:
Die Medizinische 556 (1957)
7. Jaques, L.B. und Keeri-Szanto, E.:
Canad. J. Med. Sci. 30, 353 (1952)
8. Jorpes E. und Gardell S.:
J. biol. Chem. 176, 267 (1948)
9. Wolf from M.L., und Mitarb.:
J. Amer. Chem. Soc. 72, 5796 (1950)
10. Jensen R., Snellmann O., und Syoen B.:
J. of Biol. Chem. 174, 265 (1948)
11. Piper J.:
Acta pharm. tox. 3, 373 (1947)
12. Snellman O., Jensen R. und Sylven B.:
Biochim. biophys. Acta 7, 98 (1951)
13. Allen, G.:
J. Labor. a. clin. Med. 34, 473 (1949)
14. Beller, F.K. und Steichele, D.:
Ztschr. f. ges. exp. Med. 128, 458-470
(1957)
15. Soulier, J.P. und Le Bolloch A.:
Semaine Hop. Paris 833 (1951)
16. Amann R. und Werle E.:
Klin. Wschr. 22 (1957)
17. Marbet, R., Studer A. und Winterstein A.:
Thrombose und Embolie. Int. Tag.
Basel, B. Schwabe Verl. (1954) S. 362

18. Matis, P.: Thrombose und Embolie, Benno Schwabe, Basel 1954 S.853
19. Matis P. und Knorr U.: Die Thromboembolischen Erkrankungen und ihre Behandlung. Schattauer-Verl. Stuttgart 1955 S.126
20. Hartert H.: Schweiz.med.Wschr. 84, 831 (1954)
21. Matis P.: Arzneimittelforsch. 3, 613 (1953)
22. Goossens N. und Dürr M.: Über parenterale Blutstillung 1953, Heft 4 S.225
23. Gunther, C. und Pichotka, J.: Die Naturwissenschaften, Heft 9, 193-195 (1952)

LEBENS LAUF

1933 bin ich als Sohn des Arztes Y. Mavromatis in Istanbul geboren. 1940 trat ich in die Volksschule ein und 1952 absolvierte ich in meiner Heimatstadt das "Zografyon" Gymnasium. 1952 begann ich mein medizinisches Studium an der Universität Istanbul. Seit dem Wintersemester 1953 studierte ich an der Universität zu München, wo ich im Sommer 1958 die ärztliche Prüfung mit Erfolg bestand.

